



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

TÍTULO

**EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Piper aduncum* “MATICO” SOBRE
Staphylococcus aureus ATCC 25923 COMPARADO
CON OXACILINA, ESTUDIO INVITRO**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO
CIRUJANO

AUTOR:

MENDOZA RODRIGUEZ MARÍA DEL PILAR

ASESOR:

DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

MG. JAIME POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES

TRUJILLO – PERÚ

2019



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

PÁGINA DEL JURADO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper aduncum*
“MATICO” SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 COMPARADO CON
OXACILINA, ESTUDIO INVITRO**

DRA. ANA CHIAN GARCÍA

PRESIDENTE DEL JURADO

Dra. MARÍA ROCÍO DEL P. LLAQUE SANCHEZ

SECRETARIA DEL JURADO

MG. BLOG. POLO GAMBOA JAIME ABELARDO

VOCAL DEL JURADO

Trujillo, 26 de febrero del 2019

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido lograr cruzar este largo camino y poder concretar mis objetivos, además de su infinita bondad y amor. Por ser mi guía en todos estos años de estudio, por iluminar cada uno de mis pasos, por demostrarme su presencia en mí.

A mis padres y hermanos, por ser parte vital en mi formación personal y académica, por brindarme su apoyo constante, diario e incondicional, por su lucha y su sacrificio durante todos estos años y por todo su amor brindado.

A mi familia, por su apoyo constante y por brindarme su amor y comprensión

María del Pilar Mendoza Rodríguez

AGRADECIMIENTO

A mis asesores Dra. Llaque y Dr. Jaime Polo, por su apoyo, orientación y paciencia durante el desarrollo de este proyecto, por confiar en mi persona y siempre creer que lograría este anhelado sueño de obtener mi título profesional

A la Universidad Cesar Vallejo, por todas sus enseñanzas en lo largo de la carrera.

María del Pilar Mendoza Rodríguez

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, MARIA DEL PILAR MENDOZA RODRIGUEZ con DNI: 43905883, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas , a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la tesis titulada : **Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina**, son :

1. De mi autoría
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas, por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni parcial ni totalmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos son presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por lo tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponde ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de la información aportada por la cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad Cesar Vallejo.

Trujillo, 26 de febrero del 2019

MARIA DEL PILAR MENDOZA RODRIGUEZ

PRESENTACIÓN

Señores Miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper aduncum* “MATICO” SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 COMPARADO CON OXACILINA, ESTUDIO INVITRO, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título profesional de Médico Cirujano.

(AUTORA)

ÍNDICE

PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD.....	iv
PRESENTACIÓN	v
ÍNDICE	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	9
1.2. TRABAJOS PREVIOS.....	10
1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA.....	12
1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	15
1.6. HIPÓTESIS.....	15
1.7. OBJETIVOS.....	15
1.7.1 OBJETIVO GENERAL:.....	15
1.7.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	16
II. MÉTODO.	17
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	17
2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN	18
2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	19
2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD.....	20
2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS	20
2.6. ASPECTOS ÉTICOS:.....	21
III. RESULTADOS.	22
IV. DISCUSIÓN	26
V. CONCLUSIONES	28
VI. RECOMENDACIONES	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	30
VIII. ANEXOS.....	32

RESUMEN

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del *Piper aduncum* “matico” comparado con oxacilina 1 ug sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se realizaron cuatro diluciones (100%, 75%, 50% y 25%) y un control neutro con DMSO. Se obtuvo que el aceite esencial de *Piper aduncum* mostró halos de inhibición a partir de la dilución de 75% con 13.70 mm (DS: 0.919+0.3 IC 95%(13.14-14.3)), al 100% el halo de inhibición fue de 16.50 mm (DS: 1.609+ 0.477. IC 95% (15.52- 17.48)); valores considerados como eficaces en relación al patrón CSI (>12mm), sin embargo, no supera el halo de inhibición del medicamento oxacilina con 30.60 mm (DS: 1.080+0.342. IC 95%(30.7-31.2)). A las concentraciones de 50% y 25% no se observó efecto antibacteriano. El análisis estadístico ANOVA fue altamente significativo donde se obtuvo un valor de $p < 0.01$, al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados eran homogéneos y el grupo con mayor halo de inhibición fue para oxacilina seguido del aceite esencial al 100% de la planta en estudio evidenciándose que a mayor concentración el halo de inhibición aumentaba. Se concluye que el aceite esencial del *Piper aduncum* si tiene efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* pero no superando el halo de inhibición de la oxacilina.

Palabras claves: *Piper aduncum*, eficacia, halo, aceite esencial, matico, *Staphylococcus aureus*, efecto antibacteriano

ABSTRACT

The principal objective of this research was to evaluate the antibacterial effect of the essential oil of *Piper aduncum* "matico" compared with oxacillin 1 ug on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Four dilutions (100%, 75%, 50% and 25%) and a neutral control with DMSO were performed. It was found that *Piper aduncum* essential oil showed zones of inhibition at 75% dilution with 13.70 mm (SD: 0.919+0.3 CI 95% (13.14-14.3)), at 100% the zone of inhibition was 16.50 mm (SD: 1.609+ 0.477. CI 95% (15.52- 17.48)); values considered effective in relation to the CSI standard (>12mm), however, it does not exceed the zone of inhibition of the drug oxacillin with 30.60 mm (SD: 1.080+0.342. CI 95 % (30.7-31.2)). At concentrations of 50% and 25% no antibacterial effect was observed. ANOVA statistical analysis was highly significant with a value of $p < 0.01$, and Tukey-test showed that the evaluated groups were homogeneous and the group with greater zone of inhibition was for oxacillin, followed by the essential oil at 100% concentration of the plant under study, showing that the greater the concentration, the greater the zone of inhibition. It is concluded that the essential oil of *Piper aduncum* does have an antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* but it does not exceed the zone of inhibition of oxacillin.

Keywords: *Piper aduncum*, efficacy, zone of inhibition, essential oil, matico, *Staphylococcus aureus*, antibacterial effect.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

Durante las últimas décadas podemos ver un aumento en la frecuencia de infecciones de las cuales están comprometidas las bacterias de tipo Gram positivas, entre ellas el *Staphylococcus aureus*, que ocupa entre el segundo y tercer lugar de la mayoría de infecciones nosocomiales graves.¹

Este germen tiene características particulares una de ellas es su amplia distribución, además de ser parte de la flora normal del hombre. Tiene más de treinta diferentes especies muchas de ellas son habitantes naturales de las membranas mucosas del hombre y de la piel, la bacteria se haya mayormente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel o en la ropa, puede transmitirse a diferentes partes del cuerpo o membranas mucosas provocando enfermedades de amplio espectro.²

Staphylococcus aureus es uno de aquellos gérmenes patógenos que son más importantes a nivel global, causantes de diferentes infecciones tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad, esto se debe al uso inadecuado de los antibióticos. Las infecciones nosocomiales más comunes son las vías urinarias, seguidas por bacteriemias y neumonías, en cuanto se sabe a infecciones adquiridas en la comunidad han ido aumentando significativamente en los últimos años, en las cuales se da en pacientes que hayan permanecido por largos periodos en salas de cuidados especiales, estar expuestos a procedimientos invasivos como sondas o catéteres, ya que estos favorecen el ingreso y colonización de cepas a la sangre y tejidos.²

En general, una causa importante de infecciones hospitalarias es por *staphylococcus aureus*, este constituye el motivo más común de infecciones en incisiones quirúrgicas y representa el segundo lugar, como causa de bacteriemia primaria. En las últimas décadas se han informado múltiples brotes epidémicos infecciosos extrahospitalarios causados por *staphylococcus* resistente a la metilicina en personas que no han tenido exposición previa, Estos brotes ocurrieron tanto en sitios rurales como en urbanas en regiones distintas del todo el mundo.³

En nuestro país el Ministerio de Salud hallo que las infecciones más frecuentes y peligrosas son causadas por las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *pseudomona aeruginosa* y *klebsiella pneumoniae*. Siendo el *Staphylococcus aureus* el mayor responsable de las infecciones a nivel nacional. Se encontró que el *Staphylococcus aureus* es causante del 11% de las neumonías, luego siguen las infecciones en el torrente sanguíneo en un 13%, de las infecciones de herida operatoria en

un 33%.⁴

En el instituto materno perinatal y en el Hospital Carrión se encontró a *S. aureus* como tercer responsable de infecciones en pacientes hospitalizados, en el Hospital Dos de Mayo y Hospital Belén de Lambayeque el germen estudiado representa el segundo lugar siendo los servicios de unidades de cuidados intensivos los más afectados por este microorganismo.⁵

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Benites, A. et al. (Trujillo- Perú 2017) evaluó el efecto antibacteriano del *piper aduncum* sobre *streptococcus pyogenes* Grupo A, , obteniendo una comparación en los halos de inhibición según escala de Duraffourd, observaron que *Streptococcus pyogenes* fue sensible a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *piper aduncum* obteniendo así un diámetro inferior de 8mm y un diámetro superior a 20mm, similares medidas en cuanto al control de penicilinas, sin hallar diferencia entre las concentraciones utilizadas, además evaluaron la concentración inhibitoria mínima la cual determino que todas las concentraciones utilizadas inhibieron el crecimiento de dicha bacteria obteniendo también un efecto bactericida.⁶

Flores, K. et al. (Huancayo-Perú 2016) evidencio la formación de halos de inhibición con el aceite esencial (promedio de 3,0 mm) demostrando que el aceite esencial del matico, no afecta el crecimiento de *Escherichia. Coli*, puesto que sus diámetros obtenidos no son lo suficientemente grandes como para causar un efecto bacteriostático en la bacteria, lo cual señala que para un efecto bactericida el tamaño del halo debe ser mayor a 16.0 mm, mientras que para la actividad bacteriostática se verificaría con un tamaño de halo entre 11.0 a 15.0 mm.⁷

Soto M, (Amazonas – Perú 2015) Evaluó las concentraciones de flavonoides totales de las hojas de *Piper pletatum* y *Piper aduncum*, procedentes de la región Amazonas. Dicho tamizaje se realizó utilizando reactivos de coloración y precipitación, donde los flavonoides totales se cuantificaron con el método de Kostennikova. Encontrándose una alta variedad de metabolitos en ambas especies; evidenciándose la sola presencia de saponinas en la especie de *Piper aduncum*. El contenido total en las especies de *Piper pletatum* y *Piper aduncum* fueron de $1,8 \pm 0,16$ y $2,51 \pm 0,15$ equivalentes a quercetina por cada 100g de hoja seca; Presentando mayor concentración de flavonoides la especie de *Piper aduncum* expresados como quercetina con diferencias significativas ($p < 0,05$).⁸

Aguilar R, et al. (Perú 2014) Identificaron grupos de metabolitos secundarios responsables de actividad farmacológica. La evaluación del efecto antibacteriano estuvo orientada a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) y de fracciones obtenidas después de 24 horas de incubación, se obtuvo una prueba positiva para la mezcla al 20% y al 40% a las mismas concentraciones para fracciones de cloroformo (CF1, CF2) y acetato de etilo (AE1 y AE2) las cuales presentaron actividad antibacterial frente a *staphylococcus aureus*. Las fracciones CF2 y AE2 impidieron el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* a las concentraciones de 20% y 10%. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) fue de un 10%.⁹

Valle B, et al. (Otuzco- Perú 2014) Evaluaron las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* las cuales fueron de 13,6 mg/dl (10ul), 27,2 mg/dl (20ul), 40,8 mg/dl (30ul) y 54,4 mg/dl (40ul); colocándose en placas Petri conteniendo cultivos de *Cándida albicans* y se incubaron a 37°C por 24 horas ; dando como resultado un diámetro de halo de inhibición(HI) del crecimiento bacteriano; cuyos promedios fueron 7 mm para 13,6 mg/dl (10ul); 8,4 mm para 27,2 mg/dl (20 ul); 10.2 mm para 40,8 md/dl (30ul) y 13.8 mm para 554,4 md/dl (40ul) respectivamente, concluyendo así que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* inhiben el crecimiento de la bacteria y su efecto varía según las diferentes concentraciones.¹⁰

Alva, S, et al. (Trujillo- Perú 2014) En este trabajo de investigación analizaron el efecto del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum*, siendo expresado como(CE50) de 32,4 ug/ml; evidenciándose así una acción antioxidante, in vitro, teniendo un grado de inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de 62,62%, por lo que concluyen que 32,4 partes por millón (ppm) del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* reducen un 50% la concentración inhibitoria de la lipoperoxidación humana in vitro.¹¹

Tello, Z.; et al. (Iquitos- Perú, 2013) estudiaron los resultados obtenidos en un estudio de especies botánicas donde se puede apreciar que ninguno de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* tuvieron una lectura de halos de inhibición significativos, frente a *Pseudomona auruginosa* (mm \leq 0), mientras que en *Bacillus cereus*, los aceites esenciales

mencionados tuvieron un promedio de halos de inhibición (HI) de 10 (mm), 15 (mm) y 18 (mm) respectivamente.¹²

1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

En la actualidad la Organización mundial de Salud (OMS) ha dado un amplio campo a la fitoterapia, considerándola como herramienta del futuro, que este avalado por sucesos que se han dado con el pasar de los años desde nuestros ancestros; y que en el presente se han corroborado científicamente para su aplicación en el campo de la salud.¹²

La medicina natural tiene como objetivo integrar sus creencias y manejos para su seguridad y satisfacción de la misma, algo importante que se tendrá que agregar a la opinión de los pacientes, como el punto clínico del médico tratante. Si se da correctamente y se cumple con todos estos requisitos, la fitoterapia podrá ser la iniciativa para un gran desarrollo de la ciencia.^{12, 13}

Piper Aduncum es una planta arbusto, que alcanza unos cinco a seis metros de altura, su tallo es cilíndrico, leñoso, es ramificado y tiene nudos muy bien pronunciado, sus hojas son simples, alternas, aovadas, de nervaduras muy pronunciadas, enteras con un ápice agudo, su base es asimétrica. Con los pelos glandulosos y tectores con redoma esférico desarrollado, brillante y transparente con un olor sui- generis; Las variedad del genero *Piper* de la familia Piperácea son plantas herbáceas. Chicas, generalmente estas se diferencian de las demás especies porque tienen espigas globosas con pedúnculo colateral y sus órganos vegetativos contienen células llenas de un aceite esencial lo cual elabora un sabor acre o aromático de sus diferentes especies.¹³

El género *Piper* (piperácea) se dice que cuenta con más de 2000 especies de las cuales alrededor de 500 son reportadas para el país; una de ellas es el *Piper aduncum*. Esta es una planta nativa del Perú que crece también en los valles interandinos de Bolivia, Chile, Ecuador, los nativos de la selva peruana la llaman cordoncillo a diversas especies del piper, refiriéndose a las espigas por su forma, Matico, Hierba del soldado, Moco – Moco y se usa como decocción para la desinfección externa de heridas. El hábitat de esta planta *Piper Aduncum* se desarrolla en los climas húmedos, templados y cálidos de las zonas subtropicales, también se encuentra en Cuba, Jamaica, Puerto Rico. Los aceites esenciales, aceites volátiles o esencias vegetales son combinaciones de un número variable de componentes orgánicos olorosos.¹⁴

Químicamente estos están formados por la gran mayoría de monoterpenos, y algunos componentes aromáticos. Teniendo diversas esencias, puesto que estos engloban un grupo de sustancias heterogéneas, donde se pueden encontrar más de treinta componentes. Estos aceites esenciales son

utilizados en perfumería, en industrias alimenticias o también son usadas como fuente de materia prima. Por lo tanto, en la industria estas son obtenidas por un proceso de destilación con arrastre de vapor (hidrodestilación).¹⁵

El rendimiento que tienen estas esencias que son obtenidas de plantas pueden cambiar su composición según la época en la que estas se recolectan, según el lugar geográfico y pequeños cambios genéticos de parte de la planta de la cual se extraen hojas, corteza, raíz, flores, frutos, etc.). En cuanto al uso que tiene esta planta sus hojas se pueden utilizar para infecciones urinarias, puesto que el conocimiento de las hojas conjuntamente con las flores de retama, se dejan durante una noche y al siguiente día se van a tomar como agüita de tiempo.¹⁶

También son utilizadas para el resfrió, como antidiarreico, para úlceras, bronquitis, para heridas y como un antiséptico vaginal y hasta para los herpes. Los compuestos que están presentes en esta planta son ácidos fuertes, antocianidinas, bases cuaternarias, fenoles, piperazinas, resinas, saponinas, taninos pirogálicos, triterpenos. Las plantas del género *Piper* tienen propiedades analgésicas, antirreumáticas, diuréticas, carminativas, antiflogísticas y bactericidas. El aceite esencial de dicha especie presenta propiedades antibacterial.¹⁷

Staphylococcus aureus es una bacteria que se localiza ampliamente diseminado en el ambiente ya que presenta características particulares de virulencia, agente etiológico causante de diferentes patologías, como son las infecciones de piel, tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, infecciones del SNC y del tracto genito urinario. Por lo que representa un problema grave de salud, esto es debido gracias a que su distribución se da a nivel mundial y el impacto en la morbilidad es a nivel comunitario e intrahospitalario.¹⁸

El nombre del género procede del griego *Staphylé*, que significa “en racimos de uva”. Este nombre fue propuesto en el año 1880 por el médico cirujano Alexander Ogdson y se refiere a que estos cocos Gram positivos representan al microscopio un patrón de características que le recuerda a un racimo de uvas. La forma de racimos se favorece en el cultivo en medios sólidos o líquidos; donde en tinciones de muestras clínicas los estafilococos aparecen como células aisladas o agrupadas en parejas o cadenas cortas.¹⁹

Los estafilococos, cocos Gram positivos pertenecen a la familia *Micrococcaceae*, estas bacterias son catalasa positiva, no móviles, anaerobios y aerobios facultativos que tienen la capacidad de alargar la supervivencia en superficies ambientales en diversas condiciones. El *S. aureus* se diferencia de otras especies de estafilococos porque este produce coagulasa, enzima de superficie que forma el fibrinógeno en fibrina.^{18, 19, 20}

Esta bacteria es parte de la micro flora normal del hombre, cerca del 20-50% de las personas que son sanas pueden colonizarse de manera transitoria o persistente, la parte anterior de las fosas nasales son el sitio más frecuente de colonización, aunque algunas veces también se colonizan en la piel, sobre todo cuando hay lesiones, estos diferentes sitios de colonización de la bacteria sirven de reservorio para las cepas y las futuras infecciones. ²¹

En la mayoría de estos microorganismos los componentes habituales de su pared celular son el peptidoglicano y los ácidos teicoicos. El peptidoglicano forma la mitad del peso de su pared celular y esto le da la forma y la estabilidad al microorganismo; por ello tiene una actividad tipo endotoxina, interviniendo en la patogenia de la infección. Los ácidos teicoicos presentan el 40% del peso de la pared. El *staphylococcus aureus* se desarrolla bien en medios de cultivo no selectivos, como agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro – corazón, el medio más selectivo para poder aislar a este germen es el agar sal manitol, que por su aumentado contenido de sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias gramnegativas. ²²

Por otro parte, tenemos una variedad de antimicrobianos, productos farmacéuticos de diferentes empresas, cuya composición es sintética debido a los diferentes procesos que sufren en su procesamiento bioquímico para poder tener alguna interacción sobre el organismo, sin contar que debido a la mayor presencia de diferentes microorganismo que día a día encontramos, por otra parte tenemos a la automedicación que han hecho que diversos patógenos adquieran resistencia a fármacos. ²³,

La oxacilina pertenece al grupo de las isoxazoil penicilina, resistente a la acción de la penicilinasa, es un antibiótico betalactámico bactericida que inhibe la biosíntesis de la pared bacteriana celular, tiene un amplio espectro frente a bacterias Gram positivas como : *staphylococcus aureus*. ²⁴

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparado con oxacilina a dosis de 1 ug, en un estudio in vitro?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La presente realización de este trabajo se basa en el aporte de información para mi persona en mi preparación académica dentro del rubro de la medicina y además nos permitirá conocer la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum* con el fin de poder determinar su actividad in vitro frente a bacterias Gram positivas como lo es el *staphylococcus aureus*; con ello podremos tener más conocimientos sobre las capacidades medicinales de este vegetal, mediante la elaboración de este proyecto tendremos la información pertinente y necesaria sobre el poder antibacteriano del aceite esencial Matico, como un posible tratamiento alternativo frente a las infecciones, dando a conocer a la población en general la importancia que este tiene en cuanto a su correcto uso y empleo terapéutico para las diferentes patologías causadas por este agente patógeno. Además de mostrar efectos adversos contra la salud del enfermo.

1.6. HIPÓTESIS

H₁: El aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina a dosis de 1 ug, en un estudio in vitro.

H₀: El aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” no tiene efecto bacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina a dosis de 1 ug, en un estudio in vitro.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar si el aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de *staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina a 1 µg en un estudio in vitro.

1.7.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper aduncum* a la dilución de 25%.
- Identificar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper aduncum* a la dilución de 50%
- Identificar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper aduncum* a dilución de 75%
- Identificar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper aduncum* a dilución de 100%
- Determinar el efecto antibacteriano de la oxacilina a 1 µg.

II. MÉTODO.

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Experimental con repeticiones múltiples, post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Dónde:

G1: Dilución del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” al 100%

G2: Dilución del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” al 75%

G3: Dilución del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” al 50%

G4: Dilución del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” al 25%

G5: Control positivo: a oxacilina

G6: Control negativo: agua destilada

O: Las observaciones

2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

Variable Independiente: Agente antibacteriano.

- a) No farmacológico: Aceite esencial de *Piper aduncum* “matico.
- b) Farmacológico: Oxacilina.

Variable Dependiente: eficacia antibacteriana

- a. Eficaz: Aumento del halo de inhibición.
- b. No eficaz: Disminución del halo de inhibición.

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	Para el tratamiento frente a cepas de staphylococcus aureus se utilizó: Tratamiento no farmacológico con aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> “matico ¹⁰ Tratamiento farmacológico con oxacilina ¹⁵	El aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> “matico fue dividida en los siguientes diluciones: a) 100% b) 75% c) 50 % d) 25% e) Oxacilina f) Agua destilada	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa nominal
V. D: eficacia antibacteriano	Es la disminución de la producción de bacterias ²⁶	Se consideró sensible si: ²³ ▪ Sensible para un diámetro $\geq 10\text{mm}$. ▪ Resistente para un diámetro $\leq 10\text{mm}$	Eficaz: $\geq 10\text{mm}$ No eficaz: $< 10\text{mm}$	Cualitativa nominal

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN: Fue constituida por colonias de *Staphylococcus aureus* cultivadas en las placas Petri, en el laboratorio de la Universidad César Vallejo.

MUESTRA:

Tamaño muestra: En el estudio, se aplicó la fórmula para diferencia de dos proporciones. Se obtuvo 12 repeticiones por cada grupo de experimentación.⁶ (Ver anexo 01)

Unidad de análisis: Cada conjunto de bacterias.

Unidad de muestra: Estuvo conformado por cada placa Petri.

Muestreo: se evaluó todas las placas que se utilice para desarrollar los experimentos.

CRITERIOS DE SELECCIÓN: Se consideró los siguientes criterios

Criterios de inclusión:

- Todos las placas petri viables.
- Replicaciones de cepas puras, que no tuvieron contacto con ningún tipo de reactivo o medicamento.

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron las cepas contaminadas.
- Cepas que fueron inertes.
- Se excluyeron las placas Petri con algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Se excluyeron las placas Petri con el medio de cultivo cuyo resultado pudo ser dudoso.

2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA: Fue la observación del crecimiento de las cepas en las placas petri.

PROCEDIMIENTO: Para ejecutar el experimento se consideraron los siguientes pasos:(Ver anexo 03)

- a. La planta fue identificada taxonómicamente por el Herbario Antenor Orrego - HAO. (Anexo 02)
- b. Se obtuvo el aceite esencial de *Piper aduncum* (matico) mediante el método de hidrodestilación durante 1 hora.²⁵
- c. Se utilizó el medio de cultivo agar Muller-Hinton, para el cultivo de la cepa de *Stapylococcus aureus* ATCC 25923, en la prueba de susceptibilidad, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI a través del estándar M02-A12.²⁷
- d. Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M02- A12 y M100-S28 del CLSI.²⁷

INSTRUMENTO:

La información fue recolectada en una tabla donde se tomó en cuenta el número de placa, las diluciones y las medidas en milímetros de los halos de inhibiciones según las diferentes concentraciones. (Ver anexo 05)

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

La ficha de recolección de datos fue validada por 3 profesionales de salud, médico y microbiólogo que evaluaron si el instrumento y la técnica de ensayo en laboratorio eran adecuados para el presente estudio. (Ver anexo 08)

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Los datos fueron analizados en el programa SPSS versión 24, para Windows. Las pruebas estadísticas realizadas se aplicaron con el método de análisis de varianza ANOVA para la comparación entre los promedios de los halos de inhibición del crecimiento, obtenidos en cada concentración del aceite esencial de *Piper aduncum* (matico). Se aplicó también la prueba post ANOVA de Tukey.

2.6. ASPECTOS ÉTICOS:

En el presente estudio se respetaron los criterios de las normas de ética en la investigación considerados en la Declaración de Helsinki²⁸. Se obtuvo también la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad de Ciencias Médica de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

III. RESULTADOS.

Tabla 1: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Piper aduncum* “Matico” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con el uso de oxacilina en un estudio in vitro.

DATOS DESCRIPTIVOS

Dilución	n	Media	95% de intervalo de confianza para la media		Error Estándar	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
			Límite inferior	Límite superior					
25	13	8.4	8.0	8.8	0.2	8.0	0.7	7.0	9.0
50	13	10.5	9.9	11.0	0.3	10.0	1.0	9.0	12.0
75	13	13.7	13.1	14.3	0.3	14.0	0.9	12.0	15.0
100	13	16.5	15.5	17.4	0.4	17.0	1.6	14.0	19.0
Oxacilina	13	30.6	30.0	31.2	0.3	31.0	1.0	28.0	32.0

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

Tabla 2: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Piper aduncum* “Matico” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con el uso de oxacilina en un estudio in vitro

TABLA RESUMEN DE ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4001	4	1000	891	0.000
Dentro de grupos	67	60	1		

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

$p < 0.01$

Tabla 3: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Piper aduncum* “Matico” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con el uso de oxacilina en un estudio in vitro

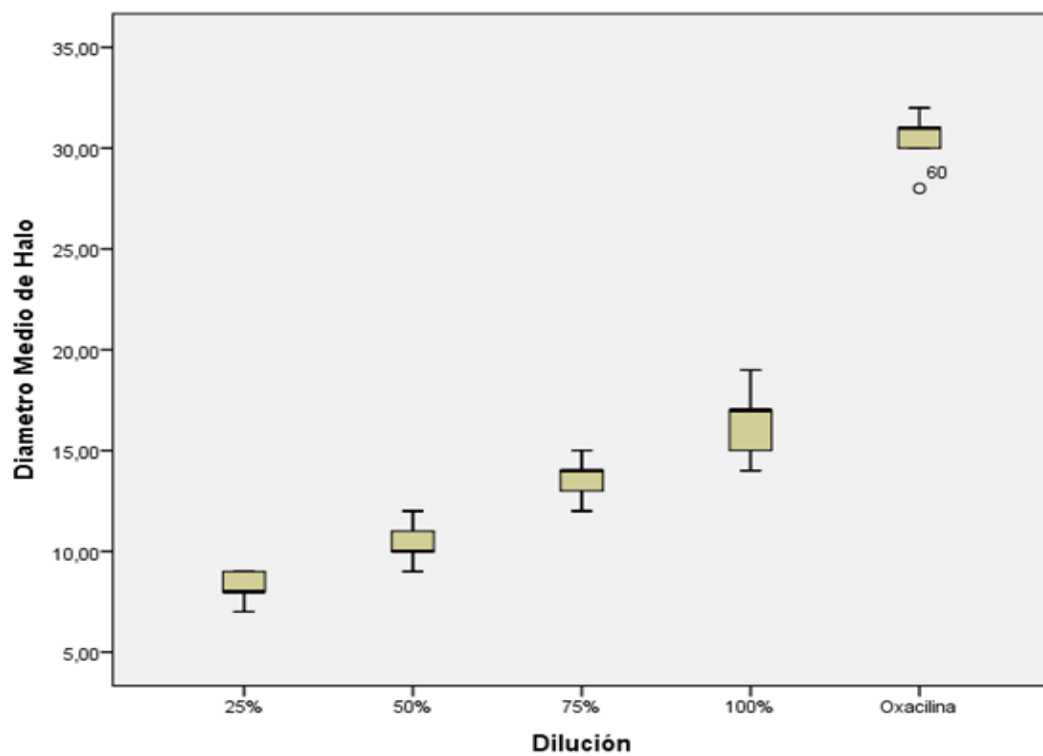
ANALISIS POST ANOVA DE HOMOGENICIDAD DE LOS DATOS: TUKEY

Dilución	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
25,00	13	8.4				
50,00	13		10.5			
75,00	13			13.7		
100,00	13				16.5	
Oxacilina	13					30.6
Sig.		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25



Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

GRÁFICO 01: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Piper aduncum* “Matico” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con el uso de oxacilina en un estudio in vitro.

IV. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina 1 ug, en un estudio in vitro; se observó 12 placas con un total de 72 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos presentaban los extractos de aceite esencial de *Piper aduncum* (matico), a distintas concentraciones (100%,75%,50%,25%) y un disco de oxacilina como grupo control positivo (tratamiento estándar) y suero fisiológico (SF) como grupo control negativo. El SF no se la consideró dentro de los datos estadísticos por tener un valor nulo en los 72 cultivos.

Los resultados en la tabla N°01 observamos las medias de los diferentes halos de inhibición. Al 50% el halo de inhibición fue de 10.5 mm (IC 95% 9.9-11; DS: 1.0+0.30). Al 75% el halo de inhibición fue de 13.70 mm (IC 95%(13.1-14.3; DS:0.919+0.3). Considerándose que con eficaces. Considerado por el CSI >10 mm. Se puede inferir que a mayor concentración mayor eficacia antibacteriana, sin embargo no superan a la oxacilina que tuvo un halo de inhibición de 30-6 mm, sin embargo en el análisis de varianza el ANOVA se observa que los resultados son altamente significativos y con un valor de $p < 0.01$. Se pudo realizar el análisis post Anova de tukey ya que los grupos fueron homogéneos y que el grupo que evidencio mayor eficacia inhibitoria fue con oxacilina.

En el grafico N°01 se puede visualizar lo anteriormente expresado donde los halos de inhibición de matico alcanzó mayor efecto antibacteriano. Al 100%. Sin embargo este último no supera a la oxacilina.

Los resultados encontrados en esta investigación son similares a los encontrados por Benites A⁶ quien obtuvo un halo de inhibición con un diámetro 20mm del extracto etanolico de *Piper aduncum* frente a diversas bacterias entre ellas *S.aureus*. Valle B.¹⁰ encontró efecto bacteriano con el uso de extracto etanolico de las hojas de *Piper aduncum* obteniendo un halo de inhibición de 13.8mm y que su efecto varía según las diferentes concentraciones.

Por otro lado los resultados encontrados por Flores K.⁷ (Perú2016) son diferentes a los resultados obtenidos en este estudio, ya que ellos utilizaron el aceite esencial del matico y obtuvieron un halo de inhibición de 11 a 15 mm con lo que concluyen que esos diámetros alcanzados no son lo suficientemente grandes para alcanzar un efecto bacteriostático ya que señalan que para dicho efecto el tamaño del halo debería ser mayor a 16.0 mm. Según escala de duraffourd, así mismo ocurre con los resultados del estudio que ejecuto Tello S.¹² que obtuvo un halo de inhibición de 10mm con el uso del aceite esencial de *Piper aduncum* considerándose dentro de los valores resistentes según CSLI.

Finalmente se puede evidenciar que existen diferencias entre los resultados obtenidos en nuestra investigación comparados con los resultados de los antecedentes citados debido a que en algunos

utilizaron otra preparación como es el extracto etanólico de las hojas de matico. Además cabe resaltar que existen factores que influyen en los resultados, ya sea el clima del habitat donde se recolecto la planta, los componentes de suelo donde se desarrolló esta. Pese a ello esta investigación logro demostrar que es de gran utilidad ya que se puede utilizar el aceite esencial de *Piper aduncum* como un coadyuvante junto a un antibiótico para infecciones originadas por *S. aureus*.

V. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Piper aduncum* tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, según los criterios del CLSI (>10 mm) sin embargo no supera el efecto inhibitorio de oxacilina.
- El aceite esencial de *Piper aduncum* a la concentraciones de 100% tuvo un halo de inhibición de 16.5 mm.
- El aceite esencial de *Piper aduncum* a la concentraciones de 75% tuvo un halo de inhibición de 13.7 mm.
- El aceite esencial de *Piper aduncum* a la concentraciones de 50% tuvo un halo de inhibición de 10.5 mm.
- El aceite esencial de *Piper aduncum* no muestra efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentraciones de 25%
- La Oxacilina a 1 µg tuvo efecto antibacteriano sobre de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, con un halo de inhibición de 30.60 mm.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar otros tipos de preparados de *Piper aduncum* para comparar con el extracto acuoso y determinar la efectividad de los diversos extractos o aceites, así como la variedad de su actividad antibacteriana.
- Aislar los principios activos causantes de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum*.
- Realizar pruebas in vivo para valorar la efectividad y la toxicidad que puedan proporcionar los componentes activos de Aceite esencial de *Piper aduncum*, así como la dosis terapéutica para la población humana.
- Realizar el estudio con la misma planta, pero obtenida de otro terreno para comprobar si los componentes del suelo o altitud y clima de la zona son influyentes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Cantón P. Ruiz-Garbajosa, Infecciones causadas por bacterias Gram positivas multirresistentes: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. *Enferm Infecc Microbiol clin.* 2013; 31(8):543-551. Citado: 21/08/2017. disponible en : <file:///C:/Users/HpLaptop/Documents/tesis/1-s2.0-S0213005X13002097.pdf>
2. Jaime A. Bustos- Martínez, Aída Hamdan-Partida, Marcia Gutiérrez-Cárdenas. *Staphylococcus aureus*: La reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 2006; 17:287-305. Citado: 21/08/2017. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio064f.pdf>
3. Reuben Ramphal. Infecciones estafilocócicas. En: De León Fraga, Javier. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 18° ed. Estados Unidos: Mc Graw Hill; 2012. p. 1160 – 1170. (Citado: 22/08/2017).
4. Oficina General de Epidemiología (OGE). Análisis de Situación de las Infecciones Intrahospitalarias en Perú. OGE - RENACE / Vig. Hosp. DT 001 - 2000 V.1 Ministerio de Salud del Perú (MINSA). (Citado: 22/08/2017. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/oge/237_oge29.pdf
5. Instituto Nacional de Salud. Informe de la Resistencia Antimicrobiana en Hospitales en Perú. Instituto Nacional de Salud (INS). Perú; 2007.
6. Benites A. Efecto bactericida in vitro de *Piper aduncum* sobre *Streptococcus pyogenes*. [Tesis] 2017 (Citado: 10/05/2018).
7. Flores K, Puente M. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum* “Matico” sobre *Escherichia coli*. [Tesis] 2016 (Citado: 22/08/2017)
8. Soto M. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. 2015; 6(1):105-116. (Citado: 22/08/2017)
9. Aguilar R, Rodríguez M, Pérez E. Metabolitos secundarios de mezcla de plantas medicinales con acción antibacterial sobre microorganismos causantes de infección puerperal en la provincia de Chachapoyas. 2014 (Citado: 22/08/2017)
10. Valle B, Yanac A. Efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* “Matico” sobre el crecimiento de *Candida albicans* in- vitro, Procedentes del distrito de Otuzco- La libertad 2014. [Tesis] (Citado: 22/08/2017)
11. Alva S, Gutiérrez M, Rengifo R. Efecto del extracto etanolico de hojas de *Piper aduncum* en la oxidación de LDL humana y concentración efectiva media para la estabilización de la especie radicalaria in vitro. *Revista farmacia*. 2014 (Citado : 22/08/2017)
12. Tello, S.; Saavedra, S. Actividad antimicrobiana in vitro de aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum*, y *Citrus medica* frente a cepas de *staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus cereus*. 2015 (Citado: 22/08/2017. Disponible en: file:///C:/Users/HpLaptop/Downloads/Zoila_Tesis_Titulo_2013.pdf
13. Organización Mundial de la Salud. (Citado: 18/Agosto/2017). Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

14. Herbandó B. El libro blanco de los herbolarios y las plantas medicinales. Madrid 2007 (citado:28/08/2017) Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/archivos/200701/260307libro-2.pdf?1>
15. Olga Lock, R., Rojas. Química y farmacología del Piper aduncum "Matico". Departamento de ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima-Perú 2004.
16. Rainer W. Bussman- Douglas S. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia. La flora mágica y medicinal del norte del Perú. Lima – Perú 2015
17. Shimabukuro, D., Torres, E. Estudio técnico la Extracción de Aceite esencial de Piper Aduncum L." Matico" y Diseño de planta piloto. Lima- Perú 2005. Citado: 28/08/2017. Disponible en : file:///C:/Users/Toshiba/Downloads/shimabukuro_yd.pdf
18. Mejía, K., Rengifo, E. Plantas Medicinales de uso popular en la Amazonia peruana. Lima, 2006. Citado:28/08/2017. Disponible en : <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/L017.pdf>
19. Gómez M, Martínez D, Meneses E, Benavides J, Pareja A. Bioactividad del extracto crudo de Piper aduncum. (Citado : 22/08/2017)
20. Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2007. Libro en línea (Citado: 12/08/2017)
21. Reuben Ramphal. Infecciones estafilocócicas. En: De León Fraga, Javier. Harrison Principios de Medicina Interna. 18º ed. Estados Unidos: Mc Graw Hill; 2012. (Citado: 12/08/2017).
22. Brooks, G.; Carroll, K.; Butel, J.; et al. Microbiología Médica. 25ª ed. Estado Unidos: Mc-Graw Hill; 2011. (Citado: 12/08/2017)
23. Forbes, B.; Sahm, D.; Wiessfeld A.; et al. Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico. 12a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009. (Citado: 12/08/2017)
24. Katzung B, Trevor A, Masters S. Farmacología básica y clínica 11º ed. México: McGraw-Hill; 2010
25. Ventura, A. Comparación de tres métodos en la extracción de aceite esencial de orégano silvestre. (citado:17/05/2018) [tesis 2017]
26. Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. Lima: Ministerio de salud, Instituto Nacional de Salud; 2005. [citado: 25 de mayo del 2017]. Disponible en URL: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1669.pdf>
27. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard– Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>
28. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. (Acceso 24/03/2015). <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 P_1 Q_1 + P_2 Q_2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Dónde:

$$Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

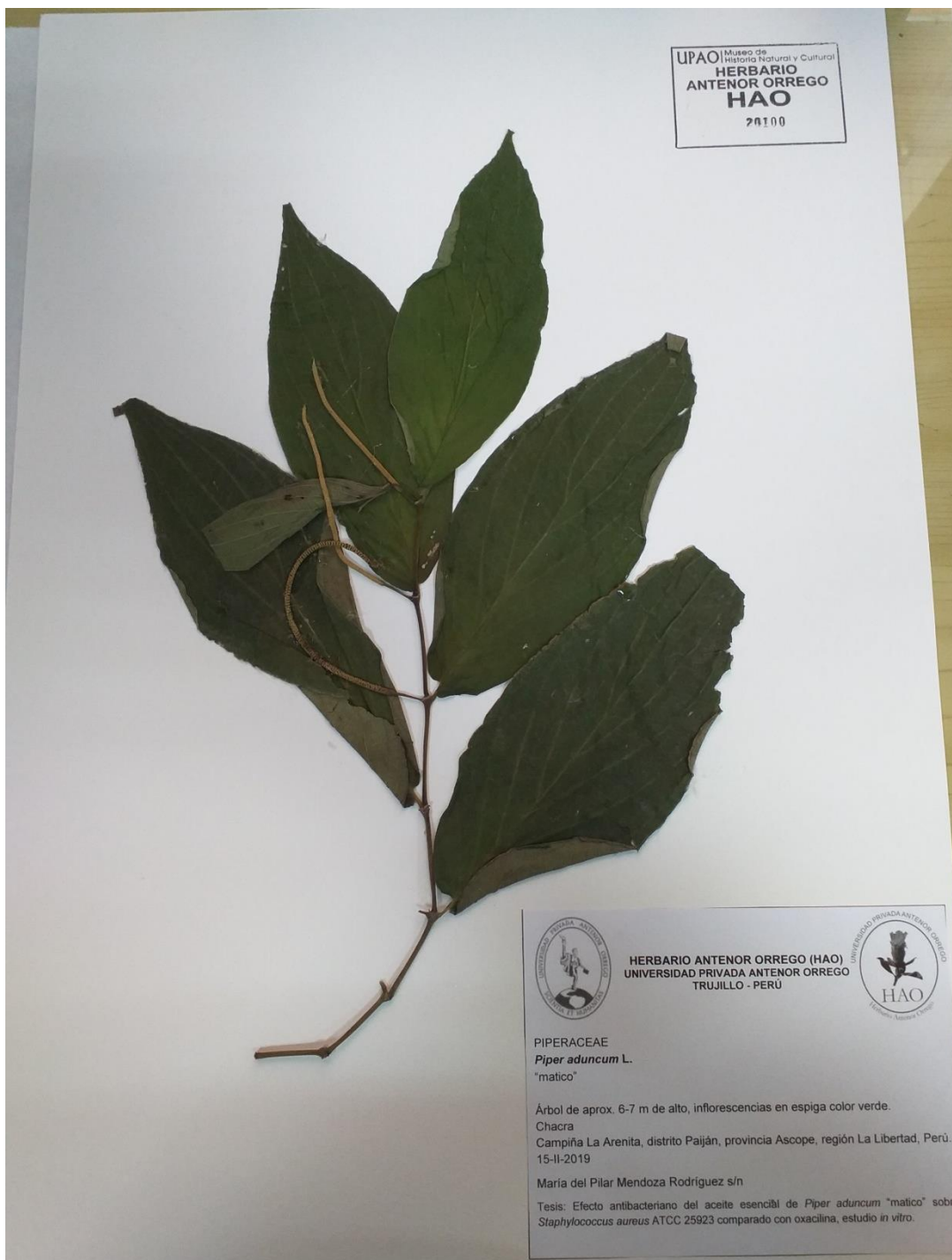
P=0.8 (P1-P2) valor asumido

$$n = 12$$

ANEXO 2

CERTIFICACION DE LA PLANTA

UPAO



EXTRACCION DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA

1. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Piper aduncum* "mático", se obtuvieron en el mercado La Hermelinda de Trujillo, en una cantidad de 5 a 6 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la "muestra fresca" (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como "muestra seca" (MS).



PLANTA *piper aduncum* "mático"



Proceso de obtención del aceite esencial de hojas de piper aduncum “matico”.

- Lavado y secado de las hojas de la planta y listas para Deshidratarlas en el horno.

2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Piper aduncum* se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.



ANEXO 04

TECNICA DE CULTIVO

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.



4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *staphylococcus aureus*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aprox.)

b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *staphylococcus aureus*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

c) Preparación de las concentraciones del AE

A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 µL de AE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de AE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de AE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%.

d) Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco de papel filtro Whatman Nº 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 µL de AE al 25% y se colocó en un disco, 10 µL de AE al 50% en otro disco, 10 µL de AE al 75% en otro disco y 10 µL de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

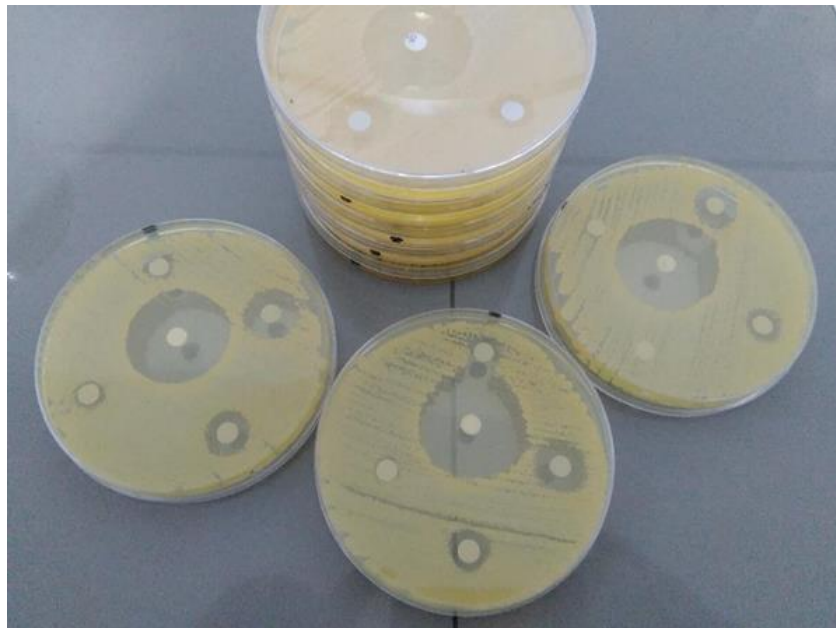
e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

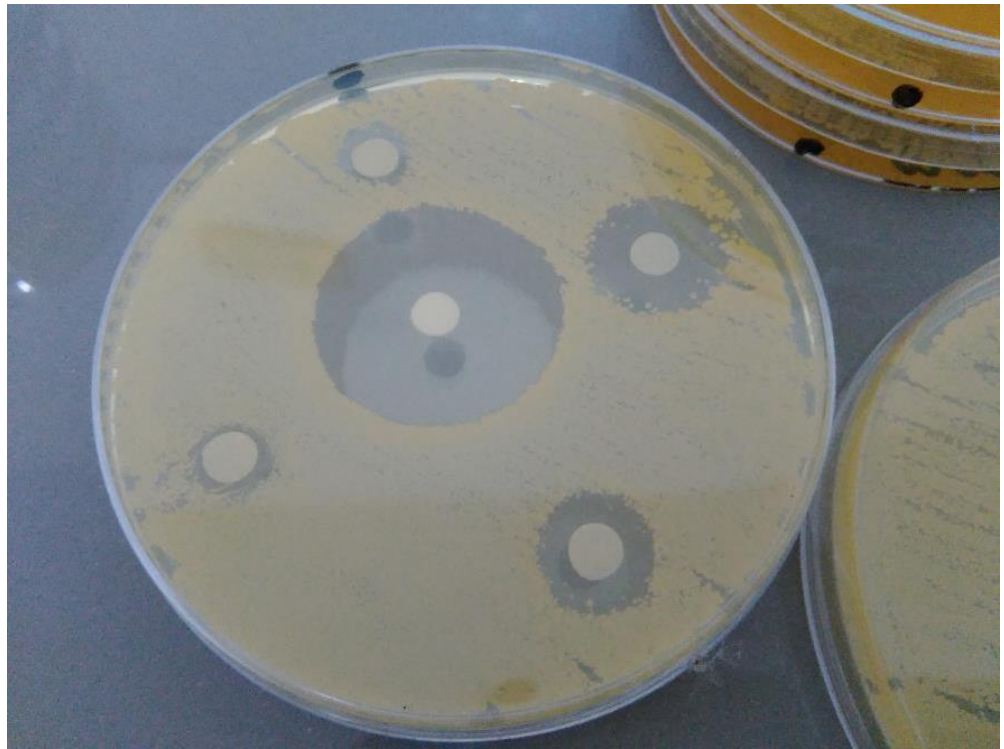
Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *staphylococcus aureus*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con oxacilina (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *piper aduncum* y para el oxacilina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.







ANEXO 05

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1												

2												
3												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos						
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación						
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial						
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir						
VALIDEZ						
APLICABLE		NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Instrumento validado por:

Firma y sello

Firma y sello

Firma y sello

ANEXO 6

FICHA RECOLECCION DE DATOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS						
ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Aceite esencial de matico				Oxacilina	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1	17	13	10	9	32	0
2	15	14	11	8	30	0
3	18	14	11	8	31	0
4	14	12	10	9	31	0
5	17	14	9	8	31	0
6	17	13	10	7	30	0
7	16	15	10	9	31	0
8	15	14	12	9	28	0
9	19	14	11	8	30	0
10	17	15	12	9	31	0

ANEXO 07

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

El personal involucrado en los diferentes procesos debe aplicar las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad (Serie Normas Técnicas N° 18-INS), aplicable al personal, uso y desecho de sustancias y materiales, acceso a los locales, y el medio ambiente.

Las principales medidas de bioseguridad incluyen:

1. Ingreso restringido al laboratorio.
2. Utilizar siempre guardapolvo o mandilones de laboratorio en la zona de trabajo.
3. El guardapolvo no debe salir de la zona del laboratorio, salvo para enviarlo a lavar.
4. No pipetear con la boca.
5. Está prohibido comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicarse cosméticos en el laboratorio.
6. En caso de tener cabello largo, recogerlo y cubrirlo.
7. Lavarse las manos luego de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
8. Utilizar protección para los ojos cuando el procedimiento genere gotas o aerosoles.
9. Utilizar siempre guantes estériles y mascarillas.
10. Las cortaduras o rasguños en las manos y brazos deben protegerse bien.
11. Utilizar zapatos protectores que cubran completamente los pies (no usar sandalias o zapatos abiertos).
12. El procesamiento de las muestras debe realizarse sobre una superficie de trabajo cubierta con papel absorbente plastificado o papel de filtro.
13. Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas por el operador antes y después de cada actividad.
14. Los reactivos deben estar etiquetados y almacenados en viales adecuados con tapa rosca.
15. Todos los laboratorios deben tener a disposición un equipo de primeros auxilios.
16. Informar inmediatamente cualquier accidente al jefe de laboratorio.
17. Debe disponer de un lugar para el lavado de ojos en caso de exposición accidental a salpicaduras.
18. Todos los desechos del laboratorio deben descontaminarse adecuadamente, antes de eliminarlos en solución desinfectante o ser auto clavado a 121 ° C durante 20 minutos, o incinerarse.
19. El material infeccioso debe ser fácilmente identificado como tal y ser esterilizado lo antes posible.
20. Limpiar a diario los pisos con un trapeador limpio y solución desinfectante.

ANEXO N°08

CONSTANCIA DE EJECUCION DE PROYECTO DE TESIS

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde la Srta. MENDOZA RODRÍGUEZ MARÍA DEL PILAR estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper aduncum* "matico" sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina", durante los días 29 de agosto al 3 de setiembre de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, sólo para fines académicos, a los 10 días del mes de setiembre de 2018.


José Luis Calla Quevedo
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0301

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo

Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo

☎ 769999 - ☎ 948649844

✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

BASE DE DATOS

			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T3 Dunnett	25,00	50,00	-2,07692*	0.32332	0.000	-3.0786	-1.0753
		75,00	-5,30769*	0.31871	0.000	-6.2939	-4.3215
		100,00	-8,07692*	0.46896	0.000	-9.5763	-6.5775
		oxacilina	-22,23077*	0.32179	0.000	-23.2273	-21.2342
	50,00	25,00	2,07692*	0.32332	0.000	1.0753	3.0786
		75,00	-3,23077*	0.37553	0.000	-4.3795	-2.0820
		100,00	-6,00000*	0.50928	0.000	-7.5856	-4.4144
		oxacilina	-20,15385*	0.37815	0.000	-21.3106	-18.9971
	75,00	25,00	5,30769*	0.31871	0.000	4.3215	6.2939
		50,00	3,23077*	0.37553	0.000	2.0820	4.3795
		100,00	-2,76923*	0.50637	0.000	-4.3479	-1.1906
		oxacilina	-16,92308*	0.37422	0.000	-18.0678	-15.7783
	100,00	25,00	8,07692*	0.46896	0.000	6.5775	9.5763
		50,00	6,00000*	0.50928	0.000	4.4144	7.5856
		75,00	2,76923*	0.50637	0.000	1.1906	4.3479
		200,00	-14,15385*	0.50831	0.000	-15.7371	-12.5706
	200,00	25,00	22,23077*	0.32179	0.000	21.2342	23.2273
		50,00	20,15385*	0.37815	0.000	18.9971	21.3106
		75,00	16,92308*	0.37422	0.000	15.7783	18.0678
		oxacilina	14,15385*	0.50831	0.000	12.5706	15.7371

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.854	4	60	0.031

| |
|
|

